

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-256288

(P2002-256288A)

(43)公開日 平成14年9月11日(2002.9.11)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 11 D 3/386		C 11 D 3/386	4 B 0 5 0
A 61 K 31/715		A 61 K 31/715	4 C 0 8 6
A 61 P 1/14		A 61 P 1/14	4 C 0 9 0
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1 4 H 0 0 3
C 11 D 3/382		C 11 D 3/382	

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-55289(P2001-55289)

(71)出願人 000240950

片倉チッカリン株式会社

東京都千代田区大手町1丁目2番3号

(22)出願日 平成13年2月28日(2001.2.28)

(72)発明者 田寺謙次郎

鹿児島県鹿児島市下荒田4丁目15番22号

(72)発明者 野口勝憲

茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内

(72)発明者 高野幸一

茨城県土浦市並木5丁目5511番地 片倉チッカリン株式会社筑波総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酸性多糖からなる酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤

(57)【要約】

【解決手段】 本発明は、バチルス・エスピー(Bacillus sp.) BS-0001(生命工学工業技術研究所受託番号FERM P 12534)から分離された酸性多糖からなる酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤に関するものである。

【効果】 本発明のバチルス・エスピー(Bacillus sp.) BS-0001(生命工学工業技術研究所受託番号FERM P 12534)より製造される酸性多糖からなる酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤は、酸性ホスファターゼ阻害とペプシン賦活のいずれも高い活性を有するものであり、食品、医薬、化学用品、農業資材等に有効に利用することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・エスピー (Bacillus sp.) BS-0001 (生命工学工業技術研究所受託番号FERM P 12534) から分離された酸性多糖からなる酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤。

【請求項2】 酸性多糖がグルコース、ガラクトース、フコース及びガラクツロン酸の单糖類で構成されることを特徴とする請求項1記載のホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定の微生物由來の酸性多糖からなるペプシン活性化剤に関し、当該活性化剤はホスファターゼ活性の阻害活性も有し、食品、医薬、生活用品、農業等の分野においての利用を可能にする。

## 【0002】

【従来の技術】これまで蛋白質加水分解酵素は、調味料、味噌、醤油、ペプチド等の製造に用いられたり、製菓、飼料、浴用剤、洗剤、胃腸消化薬に用いられるなど、多岐にわたって利用されてきた。蛋白質加水分解酵素のひとつであるペプシンは、動物の胃液に含まれ、食物の消化に大きな役割を果たしている。ペプシンも他の蛋白質加水分解酵素と同様に、産業上広く利用がされてきた。ペプシンは、至適pHが強酸性であることに特徴があり、特に酸性条件においての利用を可能にする。産業上、酵素を利用するにおいては、その活性を高めることは重要であり、ペプシンの場合、pHを酸性に調整する方法の他、動物の腺細胞から分泌されるムチンを抽出して得られるムチン抽出物の利用が試みられ、特開平6-271475号にその方法が開示されている。

【0003】一方、ホスファターゼとは、リン酸エステル及びポリリン酸を加水分解する反応を接触する酵素の総称である。酸性で作用するホスファターゼを酸性ホスファターゼ、アルカリ性で作用するホスファターゼをアルカリ性ホスファターゼ、また特定のリン酸エステルに作用するようなホスファターゼを、例えばグルコース-6-リン酸を加水分解するホスファターゼをグルコース-6-ホスファターゼというように、前に基質名を付して呼ぶのが一般的である。

【0004】ホスファターゼは、しばしばその影響が問題視される。例えば、カリウムイオン依存性アデノシン\*

## 2) 生理学的性質

- (1) 嫌気的性質
- (2) V-P反応
- (3) Egg-Yolk反応
- (4) 最高生育温度
- (5) pH 5.7培地での生育
- (6) ニュートリエント・ブロースでの生育
- (7) NaCl (5~10%) 培地での生育

\*トリホスファターゼは、胃潰瘍等の疾患の原因のひとつともされている。特公平7-51597号ではダイトサイジン類を、特開平9-20784号ではスルフェンアミド誘導体をホスファターゼ阻害剤として用い、胃酸の分泌を抑え、胃潰瘍予防治療剤としての利用が試みられている。

【0005】また、食品分野においても、ホスファターゼは、食品に元来含まれるか又はこれに含有する旨味成分であるイノシン酸、アデノシンモノfosfato、グアニル酸等の核酸に作用し、その旨味を劣化させると

10 いう問題が起きている。この問題を解決するためにホスファターゼ阻害剤として、重金属イオン、ペリリウム、フルオライド、モリブデン酸、2-ヒドロキシカルボン酸、ポリエチレンスルフォン酸、コンドロイチン硫酸等が用いられてきたが、近年、化学合成品からなる食品添加物等の安全性に対する消費者意識の高まりにより、天然物質中から採取される安全なホスファターゼ阻害剤が待ち望まれていた。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、天然物質より採取される酸性多糖からなるペプシン活性化剤に関し、当該活性化剤はホスファターゼ阻害活性をも有し、食品、医薬、生活用品、農業等の分野での利用を安全に提供するものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、バチルス・エスピー (Bacillus sp.) BS-0001 (生命工学工業技術研究所受託番号FERM P 12534) の有効利用について、鋭意研究を行ったところ、当該菌株より分泌される酸性多糖に高いペプシン活性能及び酸性ホスファターゼ阻害活性を見出し、本発明を完成するに至った。当該菌株の同定結果は以下のとおりである。

## 【0008】1) 形態

(1) 細胞の形及び大きさ

0.8×2~3μmの桿菌

(2) グラム染色法

陰性

(3) 胞子の有無・形

有り、橢円・細胞の中心に形成し、胞子のうはふくらむ

(4) 運動性の有無

40 有り

## 【0009】

生育しない

—

+

45°C

+

+

—

3

## 【0010】(8) 糖類からの酸生成

- |           |   |
|-----------|---|
| a. グルコース  | + |
| b. アラビノース | - |
| c. キシロース  | + |
| d. マンニトール | + |

## 【0011】

- |               |   |
|---------------|---|
| (9) デンプンの加水分解 | + |
| (10) カゼインの分解  | + |

3) DNA中のG+C含量 53.2

以上の菌学的性質から、Bergery's Manual Systematic Bacteriology, Vol.2(1986) を参照して同定を行った結果、本菌株はバチルス属に分類される。

【0012】本発明の酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤を得るには、先ず本菌株の培養を行う。培養は、YPMG培地、PDA培地、YG培地等を用い、好気的条件において、約30°Cで、1日から2週間行えば、効率的に菌体は増殖される。培養液中には、本菌株より生産された酸性多糖が含まれ、これをそのまま酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤として、利用することもできるが、次に培養液から酸性多糖を採取し、精製して利用することが好ましい。

【0013】培養液から酸性多糖を得るには、先ず遠心分離を行い、菌体と上澄液とに分離する。次に上澄液にエタノール等の有機溶媒を加えて搅拌し、沈殿を析出させる。沈殿を沪過した後、数回エタノール、エーテル等の有機溶媒で洗浄し、酸性多糖粗製物を得る。酸性多糖粗製物を水に溶解した後、遠心分離し、エタノール等の有機溶媒を加え、沈殿を析出させる。このとき、沈殿を促進させるために更に飽和食塩水を加えることが好ましい。その後、上述の方法と同様に、沪過、洗浄を行い、更に精製された酸性多糖組成物を得る。

【0014】更に、精製物を得るには、次にこの酸性多糖粗製物を酢酸ナトリウム等の塩溶液に溶解し、セチルトリメチルアンモニウムプロミドを含む酢酸ナトリウム等の塩溶液を添加して、沈殿を析出させる。続いて沈殿を遠心分離又は沪過により集め、これを食塩水に溶解した後、エタノール等の有機溶媒を加え、沈殿を得る。そして、沈殿を沪過後、エタノール、エーテル等の有機溶媒で洗浄し、酸性多糖を得る。この精製された酸性多糖、前段階における酸性多糖粗製物のいずれであっても、本発明の酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤として利用することができる。

【0015】また、更にこの酸性多糖を、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル沪過クロマトグラフィー等を用いて、精製することができる。本発明により得られた酸性多糖は、固体物としても、水等の溶媒に溶解した調製物としても、食品、医薬、生活用品、農業資材等に添加し、酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤として利用することができ、その量は、反応液全量に対して約0.02~0.2%とすることが好ましい。

## 【0016】

【発明の実施の形態】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【0017】実施例1

(菌株の培養) グルコース10g、ペプトン5g、酵母エキス3g及び牛肉エキス3gを蒸留水で1Lに調整(pH6.8) 後、120°C、20分間高圧蒸気殺菌したものを培地とした。菌株を培地5mLに植えて、30°C、2日間静置培養した種培養液を、500mL容坂口フラスコに張り込んだ培地に無菌的に接種し、30°C、6日間回転振盪培養した。

## 【0018】実施例2

(酸性多糖の精製) 実施例1で得られた培養液を12,000 rpm、20分間遠心分離して菌体を除いた。上澄みに3倍容のエタノールを加えて搅拌し、生成した沈殿を沪過した後、沈殿を順次エタノール、エーテルで洗浄した。乾燥し乾燥物0.30gを得た。これを300mLの蒸留水に溶解した後、遠心分離し、上澄みに5倍容のエタノールを添加した。沈殿を促進させるために飽和食塩水3mLを加えて一夜放置した。沈殿を沪過し、エタノール、エーテルで洗浄した。乾燥し、乾燥物0.24gを得た。

【0019】これを10mM酢酸ナトリウム240mLに溶解し、更にセチルトリメチルアンモニウムプロミド720mgを含む10mM酢酸ナトリウム15mLを添加し、30°Cに一夜静置した。沈殿を遠心分離で集め、5%食塩水240mLに溶解した後、5倍容のエタノールを添加して一夜静置した。生成した沈殿を沪過し、エタノール、エーテルで洗浄した。乾燥し、精製酸性多糖の乾燥物を200mg得た。

## 【0020】実施例3

(酸性多糖の分析) 実施例2で得られた精製酸性多糖を少量の蒸留水に溶解し、ダウケミカル社製ダウエックス50W×8(H<sup>+</sup>)カラム(1×10cm)に供した。カラムに蒸留水を流し、溶出された画分を減圧濃縮した後、排除限界分子量2000の透析膜で蒸留水3Lに対して2日間透析した。その間、蒸留水は12時間毎に取り替えた。透析液を凍結乾燥し、酸性多糖140mgを得た。ここで得られた酸性多糖を次に行う分析に供した。

## 【0021】1. 酸性多糖の確認

本品を赤外線吸光分析にかけたところ、その赤外線スペクトルには多糖類に特徴的な吸収帯に加え、1720cm<sup>-1</sup>にカルボキシル基を示す吸収帯が認められ、本品は酸性多糖であることが確認された。

## 【0022】2. 構成糖の確認

本品15mgを2Mトリフルオロ酢酸(TFA)で110°C、5時間加水分解した後、加水分解液を減圧下で濃縮乾固した。乾固物を蒸留水に溶解して1mLに定容し、その0.3mLは薄層クロマトグラフィー(TLC)及び单糖類の定量分析に使用した。残りをダウケミカル社製のダウエックス50W×8(H<sup>+</sup>)と1×4(AcO<sup>-</sup>)の小カラムに順次通した後、カラムを蒸留水で洗浄した。水洗液を濃縮し、中性糖画分と

した。また、 $1 \times 4(\text{AcO}^-)$ カラムには、0.5M酢酸で溶出し、溶出液を濃縮して、これをウロン酸画分とした。

【0023】得られたTFA加水分解物、中性糖画分及びウロン酸画分をワットマン社製シリカゲルG薄層プレートを用いて、TLCにかけた。TFA加水分解物に4個、中性糖画分に3個、ウロン酸画分に1個のカルバゾールー硫酸試薬に陽性のスポットが確認された。スポットのRf値から、これら4種の単糖はグルコース、ガラクトース、フコース及びガラクツロン酸であることが確認された。

【0024】また、TFA加水分解物をSalvadorらの方法 (Monosaccharide composition of sweetpotato fiber and cell wall polysaccharides from sweetpotato, cassava, and potato analyzed by the high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection method., J. Agric. Food Chem.) に従い、高性能アニオニ交換クロマトグラフィーにかけた。図1のとおり4本のピークが認められ、保持時間から、ここでもグルコース、ガラクトース、フコース及びガラクツロン酸が確認された。このときのモル比は、ピーク面積の比からグルコース：ガラクトース：フコース：ガラクツロン酸=7:6:2:5.5と計算された。ただし、ガラクツロン酸については、酸に不安定であるため、加水分解前の酸性多糖そのものを用い、カルバゾールー硫酸法 (Anal. Biochem., 4, 330-334(1962)) により定量を行い、これを用いてモル比を算出した。

#### 【0025】実施例4

(ペプシン活性化測定) 0.16mM N-アセチル-L-フェニルアラニル-L-3, 5-ジヨードチロシン1.0mL 及び実施例3で調製された酸性多糖水溶液0.25mL (対照は蒸留水) の反応混液を37°C、5分間保温した後、ペプシン (シグマ社製豚胃粘膜ペプシン) の0.01N塩酸溶液0.1mL (酵素0.1mL含有) を添加して、37°C、10分間酵素反応を行った。反応生成物をニンヒドリン法によって分析した。

【0026】結果を図2に示した。本品は、ペプシンを

顕著に活性化した。酸性多糖0.36mg/mL濃度において、本品は約200%の活性の増加率を示した。酸性多糖によるペプシンの活性化は初めての知見である。

#### 【0027】実施例5

(ホスファターゼ活性阻害測定) 20mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム100μL、0.2M酢酸緩衝液 (pH4.7) 200μL及び実施例3で調製された酸性多糖水溶液80μL (対照は蒸留水) からなる反応混液を30°C、5分間保温した後、酸性ホスファターゼ溶液 (ベーリングガーマンハイム社製馬鈴薯酸性ホスファターゼ) 20μLを加えて30°C、5分間酵素反応を行った。反応終了後、0.05N水酸化ナトリウム3mLを添加して、精製したp-ニトロフェノールを410nmで測定した。

【0028】比較例として、本品にかえて、ペクチン酸 (シグマ社製) (比較例1)、ペクチン (和光純薬工業社製) (比較例2)、コンドロイチン硫酸A (ナカライトスク社製) (比較例3) を用い、同様に分析を行った。結果を図3に示した。本品は、ペクチン酸、ペクチン、コンドロイチン硫酸Aに比較し、酸性ホスファターゼを顕著に阻害する結果であった。

#### 【0029】

【発明の効果】本発明の酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤は、バチルス・エスピー (Bacillus sp.) BS-0001 (生命工学工業技術研究所受託番号FERM P12534) より製造される酸性多糖からなるものであり、酸性ホスファターゼ阻害とペプシン賦活のいずれも高い活性を有するものである。本発明の酸性ホスファターゼ阻害活性を有するペプシン活性化剤は、食品、医薬、化学用品、農業資材等に有効に利用することができる。

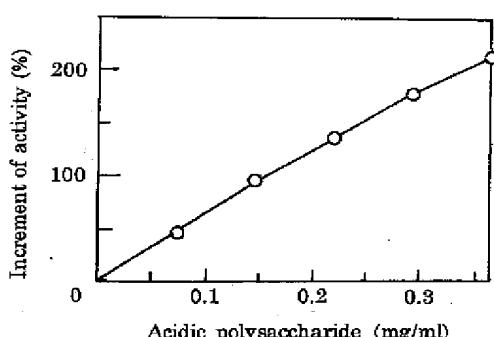
#### 【図面の簡単な説明】

【図1】酸性多糖のTFA加水分解物の高性能アニオニ交換クロマトグラフィーの結果を示す図。

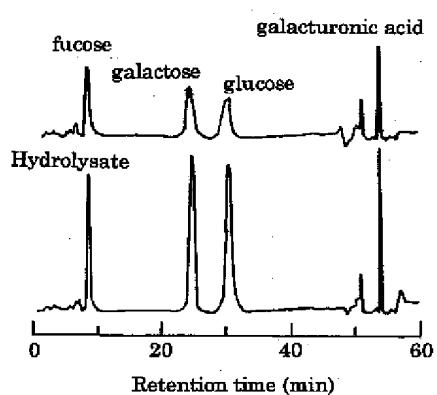
【図2】ペプシンの活性の増加率を示す図。

【図3】酸性ホスファターゼの活性阻害率を示す図。

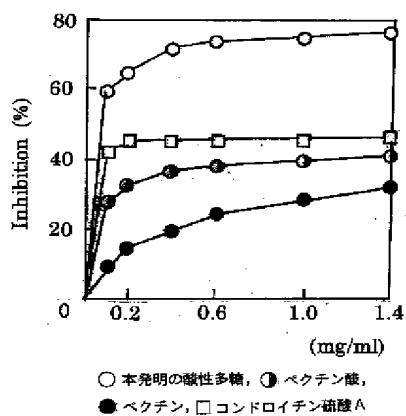
【図2】



【図1】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.C1.<sup>7</sup> 識別記号

C 1 2 N 9/00  
9/99  
// C 0 8 B 37/00  
(C 1 2 N 9/00  
C 1 2 R 1:07)  
(C 1 2 N 9/99  
C 1 2 R 1:07)

F I

C 1 2 N 9/00  
9/99  
C 0 8 B 37/00  
(C 1 2 N 9/00  
C 1 2 R 1:07)  
(C 1 2 N 9/99  
C 1 2 R 1:07)

テマコード(参考)

P

F ターム(参考) 4B050 HH01 KK07 LL01 LL02 LL10  
4C086 AA01 EA25 ZA69 ZC20  
4C090 AA10 BA64 BB12 BB13 BB21  
BB52 BC20 DA09 DA23 DA27  
DA31  
4H003 EB41 EC02 FA47